



TITLE:

Investigation on Chemical and Enzymatic
Synthesis of Tumor Associated
Carbohydrate Antigens Triggering Immune
Responses(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yamazaki, Yuji

CITATION:

Yamazaki, Yuji. Investigation on Chemical and Enzymatic Synthesis of Tumor Associated Carbohydrate Antigens Triggering Immune Responses. 京都大学, 2019, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21733>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

京都大学	博士（工学）	氏名	山崎 悠司
論文題目	Investigation on Chemical and Enzymatic Synthesis of Tumor Associated Carbohydrate Antigens Triggering Immune Responses （ 癌関連糖鎖抗原の化学および酵素合成と惹起される免疫応答に関する研究 ）		
<p>本論文は、癌関連糖鎖抗原（TACAs）を有機化学的ならびにケラタナーゼ II（KSase II）による酵素触媒的な合成法を構築するとともに、分子集合体上の TACAs に対する免疫応答を調査した研究成果を纏めたものであり、序論、本文 6 章、および結論からなっている。</p> <p>序論では、本研究における歴史的な背景と目的および本研究の概要について述べている。</p> <p>第 1 章では、ルイス x（Le^x）、硫酸化ルイス x（suLe^x）、ルイス y（Le^y）の 2 型ルイス抗原に分類される TACAs の新規かつ効率的な合成法を開発した。最初に、直交した保護基を有する 3,2'- ジオール型ラクトサミン誘導体を、ヘインズ転位を介してラクツロースから合成した。このジオール誘導体をグリコシル受容体として、フェニル 2,3,4-トリ-O- ベンジル- 1- チオ- β- L- フコピラノシドをグリコシルドナーとして用いるグリコシル化反応を行うと、ジオール誘導体は特殊な位置選択的様式でグリコシル化され、良好な収率で Le^x および Le^y 誘導体を生成した。このグリコシル化反応において、ジオール受容体中の 2 つのヒドロキシ基の反応性は 3-OH> 2'-OH であることを明らかにした。また、反応温度および供与体と受容体の当量を制御することによって、Le^x および Le^y 誘導体を選択的あるいは反応系中で同時に合成した。さらに Le^x 誘導体は、構造中のグルコサミン 6 位へ硫酸基を導入し、suLe^x 誘導体へ変換できることを示した。加えて、suLe^x、Le^x および Le^y 誘導体の還元末端に末端アジド化オリゴエチレンオキシドリンカーを導入し、TACAs を他の分子システムと組み合わせることによる機能化を可能にしている。</p> <p>第 2 章では、Bacillus sp. KS36 および Bacillus circulans KsT202 由来である 2 種類のケラタン硫酸加水分解酵素 KSase II が、 それぞれ suLe^x オキサゾリン誘導体を遷移アナログ基質モノマーとして効率的に認識して糖転移反応を触媒し、su-Le^x 二量体を良好な収率で生成することを明らかにしている。さらに、この KSase II 触媒糖転移反応における最適な反応温度ならびに pH を見出した。KSase II 触媒糖転移反応によって得られた反応生成物の核磁気共鳴（NMR）および質量（MS）分析から、su-Le^x 二量体は su-Le^x 構造が β（1→3）グリコシド結合で結合していることを明確にした。またこれらの結果により、Bacillus circulans KsT202 由来の KSase II の触媒メカニズムが基質支援機構（Substrate-Assisted Mechanism）であることを示唆している。</p> <p>第 3 章では、ケラタン硫酸の繰り返し単位構造を有する種々のオキサゾリン誘導体と糖受容体を組み合わせることにより、KSase II によって触媒される糖転移反応の反応特異性を解明している。まず、KSase II 触媒糖転移反応は suLe^x 二量体のようなかさ高い糖受容体を用いた場合では進行しなかった。また、suLe^x オキサゾリン誘導体と硫酸化ラクトサミン（suLacNAc）を組み合わせた場合では、連続的な糖転移反応が進行せず、5 糖 suLe^x-suLacNAc のみが生成した。さらに、ジ硫酸化ラクトサミン（disuLacNAc）オキサゾリン誘導体の KSaseII 触媒反応は、disuLacNAc 二量体のみを生成していた。これらの結果から、KSaseII の触媒中心およびアクセプターサイト（+3+4 サブサイト）の構造がトンネル状であることを考察している。</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	山崎 悠司
<p>第4章は、シアル酸含有オリゴ糖を結合したポリサルコシン（PSar）とポリ乳酸（PLLA）で構成した両親媒性ブロックポリマー（PSar-PLLA）で調製した高分子ミセル（ラクトソーム）を用い、シアル酸含有オリゴ糖がラクトソームに対する免疫応答を抑制することを示している。ラクトソームを被覆した糖鎖には、5-<i>N</i>-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）あるいは5-<i>N</i>-アセチルノイラミニル-α（2\rightarrow6）-ガラクトシル-β（1\rightarrow4）<i>N</i>-アセチルグルコサミン（Neu5Ac α（2\rightarrow6）Gal β（1\rightarrow4）GlcNAc β）を用いている。調製した2種類のシアル酸を提示したラクトソームは、シアル酸糖鎖を持たないラクトソームよりも抗PSar IgM産生が減少した。その結果、シアル酸提示ラクトソームはマウス（BALB/C nu nu）中でのラクトソームに対する accelerated blood clearance（ABC）現象を減少させることを示した。特に Sigkec-G および CD22 のリガンドである Neu5Ac α（2\rightarrow6）Gal β（1\rightarrow4）GlcNAc β で被覆したラクトソームを用いるとその免疫抑制効果が大きいことを明らかにしている。</p> <p>第5章では、Le^y抗原を表面に提示した形態の異なる分子集合体を作製し、分子集合体上のLe^yの抗原性を評価した。まず、Le^yを親水部末端に有するPSar-PLLA（Le^y-PSar-PLLA）および、PSarと疎水性ヘリックスブロックにロイシン（D-or L-Leu）とアミノイソ酪酸（Aib）との交互配列12量体あるいは16量体を用いた両親媒性分子ポリペプチドを合成した（Le^y-PSar-（D-or L-LeuAib）_{6 or 8}）。これらのLe^yを提示する両親媒性ポリペプチドを組み合わせることにより、Le^yを表面に提示するカーブシート、ナノチューブ、ベシクル、試験管状構造、およびナノシート状の分子集合体を形成することを透過型顕微鏡（TEM）によって確認した。球状ミセル、カーブシート、ナノチューブ、および試験管状構造の分子集合体をマウスへの投与することによって、抗PSar IgMが大量に産生したが、抗Le^y IgM産生は少量であった。一方で、Le^yを提示するナノシートは、効率的に抗Le^y IgMの産生を誘導し、抗PSar IgM産生を抑制した。さらに、産生した抗Le^y IgMの特異性は、分子集合体表面の抗原密度によって異なることを明らかにしている。したがってLe^yの抗原性は、分子集合体表面上の抗原の環境に依存することを考察している。</p> <p>第6章では、異なる表面密度でナノキャリアに提示されたLe^y抗原に対する免疫応答を評価した。まず、Le^y抗原を高密度に提示するナノキャリアを得るために、分子中に2つのLe^y抗原を末端に有するA2B型両親媒性ポリペプチド（（Le^y-PSar）₂-（D-or L-LeuAib）₆）を合成した。（Le^y-PSar）₂-（D-LeuAib）₆と（Le^y-PSar）₂-（L-LeuAib）₆の等モル混合物は、Le^yを高密度に提示するようなシート状の分子集合体を形成することをTEMおよび原子間力顕微鏡（AFM）によって同定した。このシート型の分子集合体は抗Le^yIgMの産生を誘導したが、2度目の投与後にその抗体産生は抑制されていた。さらに、このシート状分子集合体を2回投与した後の抗体産生量は、Le^y量及び密度が低いシート状の分子集合体を投与した場合よりも低下した。結合活性に関しても、2回のLe^yを超高密度に有するナノシートによって産生した抗体は、1度目の投与によって産生した抗体の結合活性よりも低下した。つまり、超高密度のTACAsを提示するナノキャリアを投与した場合、免疫応答が抑制するようなメカニズムが働いていると推測している。このように、B細胞を介したTACAsの免疫応答はナノキャリア上のLe^y抗原の幾何学的配置に敏感に影響を受けることを示唆している。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、癌関連糖鎖抗原 (TACAs) を有機化学的ならびにケラタナーゼ II (KSase II) による酵素触媒的な合成法を構築するとともに、分子集合体上の TACAs に対する免疫応答を調査した研究結果を纏めたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 直交に保護した 3,2'- ジオール型ラクトサミン誘導体を合成し、このジオール誘導体を用いるグリコシル化によって、位置選択的にルイス x 抗原 (Le^x) およびルイス y 抗原 (Le^y) 誘導体が効率的に合成可能であることを示している。また、この Le^x 誘導体は容易に硫酸化 Le^x 誘導体 ($suLe^x$) に変換も可能である。また、ケラタン硫酸加水分解酵素 KSase II が $suLe^x$ をはじめとする様々なケラタン硫酸繰返し単位のオキサゾリン誘導体を認識し、繰返し単位が β (1 \rightarrow 3) グリコシド結合を形成する糖転移反応が進行することを明らかにしている。さらに、種々のオキサゾリン誘導体とグリコシルアクセプターを組み合わせ、KSase II による糖転移反応を行い、KSase II の触媒活性中心とアクセプターサイトの構造がトンネル様の構造を有すると考察している。
2. 分子集合体上に担持した糖鎖に対する免疫応答を解析することで、糖鎖と免疫応答との関係を調べている。例えば、シアル酸含有糖鎖を有する両親媒性分子を合成し、シアル酸を提示する高分子ミセルを調製している。表面上のシアル酸は、分子集合体に対する免疫応答を抑制することを明らかにしている。また、 Le^y を親水部末端に有する数種類の両親媒性ポリペプチドを合成している。これらを組み合わせることによって、 Le^y を表面に提示した高分子ミセル、カーブシート、チューブ、ベシクル、試験管構造およびナノシート構造の分子集合体を調製した。これらの分子集合体をマウスへ投与して、抗 Le^y IgM および抗ポリサルコシン IgM の産生を解析し、ナノシート状のナノ粒子を投与すると効率的に抗 Le^y IgM 産生を誘導できることを示している。異なる表面密度でナノキャリアに提示した Le^y に対する免疫応答を評価することで、非常に高い密度で提示された Le^y によって抗体産生が低下し、B 細胞を介した免疫応答が Le^y の幾何学的配置によって敏感に影響を受けることを見出している。

以上要するに、本論文は、合成困難な硫酸化 TACAs の合成方法を開発し、TACAs を表面に提示したナノ粒子上を用いて免疫応答を解析して糖鎖に対する免疫応答を解明しており、糖鎖を利用した医療材料や糖鎖が関与する疾病の治療開発への貢献が期待でき、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 1 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。